

51457-2001700-10361

# DELPHION

[Select CR](#)

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)

[RESEARCH](#) [PRODUCTS](#) [INSIDE DELPHION](#)  
[My Account](#) [Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help](#)

## The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: [Add to Work File](#) [Create new Work File](#) [Add](#)

View: [Jump to: Top](#) [Go to: Derwent](#)

☒ [Email this to a friend](#)

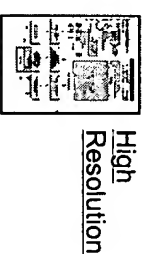
Title: CN1400315A: Gene chip high-flux quick detection technique

Derwent Title: Gene chip high-flux quick detection technique [Derwent Record]

Country: CN China

Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection I

Inventor: HEYAO WANG; China  
WENJIE ZHENG; China



Assignee: WANG HEYAO China  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 2003-03-05 / 2001-07-30

Application Number: CN2001000123528

IPC Code: IPC-7: C12Q 1/68;

ECCLA Code: None

Priority Number: 2001-07-30 CN2001000123528

Abstract:

The present invention discloses a universal detection technique for gene chip and its application. Said invention greatly simplifies the operative steps for detecting gene chip, can effectively prevent mutual interference of tens of hundreds of primer pairs when high flux detection is made so as to implement high flux rapid detection of gene chip, and the stability, specificity, sensitivity and reproducibility of detection result are good.

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title

<input checked="" type="checkbox"/>	CN1400315A	2003-03-05	2001-07-30	Gene chip high-flux quick detection technique
1 family members shown above				

Other Abstract  
Info:

CHEMABS 141(22)361475R



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thomson Corporation

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12Q 1/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01123528.4

[43] 公开日 2003 年 3 月 5 日

[11] 公开号 CN 1400315A

[22] 申请日 2001.7.30 [21] 申请号 01123528.4  
[71] 申请人 王鹤尧  
地址 100089 北京市海淀区远大路世纪园 6  
区 6 号楼 5C  
共同申请人 郑文婕  
[72] 发明人 王鹤尧 郑文婕

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 一种新的基因芯片高通量快速检测  
技术

## [57] 摘要

本发明公开了一种新的基因芯片通用检测技术及其应用, 本发明极大简化了基因芯片检测的操作步骤、有效避免了高通量检测时成百上千对引物的相互干扰, 实现了基因芯片的高通量快速检测, 检测结果的稳定性、特异性、灵敏度和重复性都很好。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 检测样品中是否存在目标 DNA 或 RNA 的基因芯片固相引物延伸技术，其特征是：
- ①所述的基因芯片为按照一定的排序将寡核苷酸的 5'端连接在基因芯片的固相载体上而制成，所述的寡核苷酸的 5'端是通过共价键或非共价键而连接在基因芯片的固相载体上的；
- 5 ②所述的固相引物为所述的 5'端通过共价键或非共价键与基因芯片的固相载体连接的寡核苷酸，所述的固相引物的 3'端区域的核苷酸序列可与目标 DNA 经变性（或解链）所产生的两条 DNA 单链之一因互补配对而发生退火，或可与目标 RNA 因互补配对而发生退火；
- ③所述的固相引物延伸为所述的固相引物与所述的目标 DNA 单链或目标 RNA 退火后，在依赖于模板的 DNA 聚合酶作用下，沿引物的 3'端延伸出与目标 DNA 单链或目标 RNA 互补的产物 DNA 单链。
- 10 ④所述的产物 DNA 单链在延伸的同时或随后被标记上信标分子，通过检测基因芯片上信标分子的信号，从而判断出样品中是否存在所述的目标 DNA 或目标 RNA。若有信标分子的信号，则样品中有目标 DNA 或目标 RNA，若无信标分子的信号，则未发生固相引物延伸，样品中无目标 DNA 或目标 RNA。
- 15 2. 权利要求 1 所述的依赖于模板的 DNA 聚合酶是：大肠杆菌 DNA 聚合酶 I（全酶）、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段、T4 噬菌体 DNA 聚合酶、测序酶（T7 噬菌体 DNA 聚合酶）、Taq 酶、反转录酶。
3. 权利要求 1 所述的信标分子是荧光素、同位素或生物素。
4. 权利要求 1 所述的固相引物，在其与基因芯片固相载体连接的 5'端可以添加一个目的在于增加该引物的空间活动性以利于退火或杂交的连接臂，所述的连接臂是：多聚胸腺嘧啶核苷 poly(dT)<sub>n</sub> ( $n \geq 5$ )、多聚尿嘧啶核苷 poly(dU)<sub>n</sub> ( $n \geq 5$ )、多聚腺嘌呤核苷 poly(dA)<sub>n</sub> ( $n \geq 5$ ) 或聚乙二醇等长链状的分子。
- 20 5. 权利要求 1 所述的固相引物延伸技术的应用。

## 一种新的基因芯片高通量快速检测技术

5 本发明涉及新的基因芯片高通量快速检测技术以及它们的应用。

### 一. 基因芯片的发展现状:

美国继开展人类基因组计划以后, 于 1998 年正式启动基因芯片计划, 美国国立卫生部、能源部、商业部、司法部、国防部、中央情报局等均参与了此项目。同时斯坦福大学、麻省理工学院及部分国立实验室如 Argonne Oakridge 也参与了该项目的研究和开发。英国剑桥大学、欧亚公司正在从事该领域的研究。世界大型制药公司尤其对基因芯片技术用于基因多态性、疾病相关性、基因药物开发和合成或天然药物筛选等领域感兴趣, 都已建立了或正在建立自己的芯片设备和技术。

在国内, 虽然起步略晚一些, 但清华大学、复旦大学、北京军事科学院、南京东南大学等科研机构都在做芯片的研发工作。这些单位所进行的工作主要是将基因芯片用作基因功能的研究, 也即是把芯片当作“基因表达谱芯片”, 它所做的工作是从几百条、几万条、十几万条基因中筛选出具有某种功能的基因。但是基因芯片筛选作用的不完整性, 决定了它目前只能供科研使用, 尚不能进入临床使用。目前国内也有的公司在开发临床诊断用的基因芯片, 但由于都采用以下实验路径, 烦琐而且灵敏度不高, 重复性不好, 低密度的基因芯片尚可应用, 高密度的基因芯片则从 PCR 反应到杂交都难以控制, 导致临床诊断用的基因芯片难以进入临床实用。

目前所有的 DNA 芯片技术都包括四个基本要点: DNA 阵列(微排序)的构建、样品(DNA 或 RNA)的扩增和标记、杂交和杂交结果的检测及读出。

DNA 阵列(微排序)的构建: 目前制备芯片主要采用表面化学的方法或组合化学的方法来处理固相载体(玻璃片或硅片), 然后使 DNA 片段按顺序排列在固相载体上。因固相载体种类较多, 制备方法也不尽相同, 但基本上可分为两大类: 一类是原位合成(in situ Synthesis); 一类是合成后交联(post-synthesis attachment)。原位合成适用于寡核苷酸; 合成后交联多用大片段 DNA, 有时也用于寡核苷酸, 甚至 mRNA。

样品 DNA 或 RNA 的扩增和标记: 生物样品往往是非常复杂的生物分子混合物, 除少数特殊样品外, 一般不能直接被芯片检测, 必须将样品进行处理。从血液、活组织或其它标本中获取的 DNA/mRNA 样品, 必须扩增以提高阅读灵敏度, 同时标记上荧光素、同位素、生物素等检测信标, 但这一过程操作起来却有一定的难度。比如在一个癌细胞中有成千上万个正常基因的干扰, 杂合癌基因的检测和对它的高效、特异地扩增就不是一件容易的事。因为在一般

溶液中聚合酶链反应(PCR)扩增时,存在其它不同的DNA片段与靶片段竞争引物的情况。另一种情况是基因芯片通常要检测很多的目标DNA,而在PCR扩增时,如果反应体系中同时存在很多对引物,则引物和模板DNA之间互相干扰和竞争,反应产物往往不是目标DNA,若进一步进行芯片检测,则可能出现假阳性结果。

5 杂交:杂交是DNA芯片技术中除DNA微排序和样品扩增外最重要的一步,其复杂的程度和具体条件的控制由芯片上的DNA片段的长短和芯片本身的用途而定。如果是表达检测,杂交时需要高盐浓度、低温和长历时(往往要求过夜),但严谨性要求则比较低。如果要检测是否有突变,因涉及单个碱基的错配,故需要在短时间内(几小时)、低盐、高温条件下高严谨性杂交。

10 杂交结果的检测和读出:目前对目标DNA大多采用荧光标记法,并根据各杂交点的荧光信号强弱用扫描共焦显微镜或激光共聚焦扫描读出结果。它的优点是重复性好,缺点是灵敏度相对较低。为此,人们正在研究多种替代方法,如:质谱法、化学发光和光导纤维、二极管方阵检测、乳胶凝集反应、直接电荷变化检测等等。其中最具有前途的当推质谱法,但由于在探针的化学合成上还存在一些问题,质谱法还不如荧光标记法用得普遍。

15 在实际的实验中,由于基因芯片都采用的是上述的四个步骤,导致了基因芯片迟迟不能进入大规模实际应用。

为了解决PCR反应中的多对引物和模板的相互干扰,美国Mosaic Technology公司发展了一种固相PCR系统。此系统包含两套引物,每套都可以从靶基因两头延伸。当引物和DNA样品及PCR试剂相混时,如果样品包含靶序列,DNA就从引物两头开始合成,并在引物之间  
20 形成双链DNA环或“桥”。由于上述反应在固相中产生,因而避免了引物竞争现象,并可减少残留物污染和重复引发。这种固相PCR系统的专利,保护的是同时、相邻地固定在光导纤维末端上的一对引物,并用这对引物扩增目标DNA,最终检测的是经过扩增而在这对引物之间形成的桥连DNA。在该技术中,如果只是单条引物扩增,未形成桥连DNA,则检测不出信号,见(美国专利US5641658, <http://www.mosaic.com>)。

25

## 二. 本发明的具体说明:

本发明的基因芯片高通量快速检测技术,是通过固相引物(或称为探针)延伸检测技术而实现的,该技术是将作为引物(或称为探针)的寡核苷酸的5'端连接在固相(即基因芯片的固相载体)上,引物与相应的DNA单链模板(即目标DNA)或RNA(即目标RNA)退火后,  
30 使用依赖于模板的DNA聚合酶,在含有信标分子的相应的反应体系中进行5'→3'DNA聚合,沿引物的3'端延伸出与目标DNA单链互补的产物DNA单链,这种产物DNA单链在延伸的同时被标记上信标分子,延伸结束后,洗涤去除DNA聚合反应的各种游离成分。标记上信标分

子的产物 DNA 单链被牢固连接在固相上。检测固相上的信标信号。若有信号，则表示被检测样品中有目标 DNA 或目标 RNA；若无信号，则表示被检测样品中没有目标 DNA 或目标 RNA。本发明的固相引物延伸检测技术的特异性，由引物的长度和引物与目标 DNA 在反应中严格控制的退火温度和盐浓度决定；本发明的灵敏度，即掺入信标的信号强度，则可由聚合产物 DNA 单链的尽量长的延伸使更多的信标分子被掺入而被放大，这是本发明的第一种信标标记方法。

本发明的第二种信标标记方法包括两个步骤，第一个步骤是采用与上述第一种信标标记方法相同的步骤，但 DNA 聚合反应体系中不含信标分子，延伸反应结束后，得到未被信标标记的聚合产物 DNA 单链；第二个步骤是在含信标分子的 DNA 聚合反应体系中，通过与此聚合产物 DNA 单链下游核苷酸序列互补的、未连接在固相上的引物进行第二次 DNA 聚合反应，生成与原聚合产物 DNA 单链互补的新的被标记上信标的 DNA 单链，只要不对这前后两条聚合产物单链所形成的 DNA 互补双链解链，就可通过检测这些被标记上的信标信号而确定目标基因。

本发明的第三种信标标记方法是，将所述的第一种和第二种信标标记方法结合起来，使第一种标记方法所述的固相引物延伸的聚合产物 DNA 单链被标记上信标，然后再用所述的第二种信标标记方法的第二个步骤产生一条与之互补的被标记上信标的单链，检测这两条单链互补配对所形成的 DNA 双链的信标信号就可确定目标基因。

本发明的固相引物延伸中所使用的依赖于模板的 DNA 聚合酶，包括，但不限于，大肠杆菌 DNA 聚合酶 I（全酶）、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段、T4 噬菌体 DNA 聚合酶、测序酶（T7 噬菌体 DNA 聚合酶）、Taq 酶、反转录酶。

本发明的基因芯片所采用的固相载体选自任何可用于制备基因芯片的材料，其包括，但不限于，玻璃片、硅片和塑料片。所述的固相载体经不同的化学修饰后，在其表面带有可以固定核酸分子的活性基团。这些基团包括，但不限于，氨基（ $-NH_2$ ）、醛基（ $-CHO$ ）、羧基（ $-COOH$ ）和巯基（ $-SH$ ）。

本发明的基因芯片是在所述的固相载体上连接有针对特定的目标基因或目标 DNA 或目标 RNA 的特异性核酸引物（或称为探针），所述的引物为单链 DNA 分子，其核苷酸序列选自目标基因或 DNA 双链中的任一条链或选自目标 RNA 的互补序列，而且在适当的条件下可以与该目标基因或 DNA 解链后的单链之一或与目标 RNA 特异杂交。所述的引物可以通过 DNA 自动合成或 PCR 扩增而获得，其长度至少为 15 个核苷酸，优选至少为 20 个核苷酸，更优选至少为 30 个核苷酸，还更优选至少为 40 个核苷酸，还更优选至少为 50 个核苷酸，最优选至少为 60 个核苷酸，还最优选至少为 70 个核苷酸。所述的引物（或称为探针），其 5' 端可以直接连接在固相载体上，或在其 5' 端可以选择性地添加一个目的在于增加该引物的空间活动性以利于杂交的连接臂，引物通过连接臂而连接在固相载体上。所述的连接臂包括，但不限于，多聚胸腺嘧啶核苷  $\text{poly(dT)}_n$  ( $n \geq 5$ )、多聚尿嘧啶核苷  $\text{poly(dU)}_n$  ( $n \geq 5$ )、多聚腺嘌呤核苷

poly(dA)<sub>n</sub> ( $n \geq 5$ ) 或聚乙二醇等长链状的分子。

在本发明的基因芯片中, 所述的核酸引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被修饰(连接)有活性基团。这些活性基团包括, 但不限于, 羧基(-COOH)、氨基(-NH<sub>2</sub>)、巯基(-SH)、苯硼酸(phenylboronic acid)、乙烯基(CH<sub>3</sub>C=CH<sub>2</sub>)等。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被羧基修饰, 则羧基与固相载体表面的氨基反应, 形成酰氨键而将该引物以共价键连接到固相载体上。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被氨基修饰, 则氨基与固相载体表面的醛基或羧基反应, 形成酰氨键而将该引物以共价键连接到固相载体上。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被巯基修饰, 则巯基与固相载体表面的巯基反应形成二硫键而将该引物以共价键连接到固相载体上。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被苯硼酸基修饰, 则苯硼酸与固相载体表面的水杨基氧肟酸(salicylhydroxamic acid)反应形成共价键而将该引物连接到固相载体上。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被乙烯基修饰, 则乙烯基与固相载体表面的巯基反应形成硫醚键而将该引物以共价键连接到固相载体上。如引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端被生物素(biotin)修饰, 则生物素与固相载体表面的链霉亲和素(streptavidin)或亲和素(avidin)结合, 形成非共价键而将引物固定在固相载体上。

本发明的基因芯片的制备, 是利用微排序法按照设计将所述的核酸引物(或称为探针)有序地点样到固相载体上, 通过核酸引物的 5' 端或与引物的 5' 端相连的连接臂的 5' 端修饰的活性基团与载体表面相应的活性基团反应, 形成共价或非共价连接, 将核酸引物固定于载体上, 从而制成基因芯片。同时, 在所制备的基因芯片上, 每一种核酸引物(或探针)都有固定的位置, 因此在它们通过固相引物延伸得到与目标 DNA 单链互补的被标记上信标的产物 DNA 链后, 通过对基因芯片所发出的信标信号的寻址即可确定其对应的特定核酸探针, 从而确定与其对应的目标基因。

本发明的固相引物延伸检测目标 DNA 或 RNA 的延伸和标记方法, 可以利用本领域已知的各种核酸延伸和标记方法, 使连接在基因芯片固相载体上的寡核苷酸引物或探针延伸, 产生出与目标 DNA 或 RNA 互补的单链, 此单链在延伸的同时被信标标记和/或随后被另一条与之互补的新的被标记单链而加强标记或被标记。所述的延伸和标记方法包括, 但不限于, PCR、RT-PCR、体外转录、随机引物标记、缺口平移以及末端转移标记等方法。所述的信标分子可以为荧光素、同位素或生物素; 所述的荧光素包括, 但不限于, Cy3、Cy3.5、Cy5、异硫氰酸荧光素、德克萨斯红; 所述的同位素包括, 但不限于, <sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H; 所述的生物素包括, 但不限于, 生物素、光敏生物素、长臂光敏生物素。PCR、RT-PCR、体外转录、随机引物标记、缺口平移以及末端转移标记等方法是本领域已知的。延伸和标记后, 根据所选用的信标分子采用相应的检测方法对基因芯片进行扫描分析, 根据所捕获阳性信号的位置寻址, 判断所检



测的目标 DNA 或 RNA。在信号采集和分析过程中所需的设备均已经商品化。

从操作步骤来看, 本发明直接将目标 DNA 或 RNA 在芯片上进行固相引物延伸, 几分钟到几十分钟反应完成后简单洗涤即可进行荧光扫描, 简单快速; 避免了目前常用的先用 PCR 扩增目标 DNA 或 RNA, 再将扩增产物与芯片上的探针杂交的耗时约为 6 至 10 小时的复杂冗长步骤。从检测结果的特异性来看, 本发明在进行固相引物延伸时, 由于不同的引物都被固定在不同的区域, 因此即使同时检测上千个不同的目标 DNA 或 RNA, 这些引物都不会相互干扰, 从而真正达到了目前的基因芯片检测所难以达到的高通量、高准确性检测; 而且受引物长度、引物与模板退火时的碱基互补配对所决定的杂交特异性、严格的退火温度和盐浓度等因素影响, 本发明对所检测的目标 DNA 和 RNA 具有高度特异性。从检测结果的信号强度看, 由于在引物固相延伸时, 聚合产物 DNA 单链可以尽量长地延伸并不断掺入信标分子, 因此信号强度大, 信号结合牢固。

通过以下实施例对本发明的基因芯片的制备、固相引物延伸、检测方法及其应用进行描述。需说明的是, 下述实施例只是用来说明而非限制本发明, 本领域技术人员所熟知的其他通过基因芯片对目标 DNA 或目标基因进行检测的技术均在本发明的范围内。

15

实施例 1 通过酰胺键将引物连接在固相载体上制成基因芯片, 用 Taq 酶延伸固相引物以检测目标基因 (目标 DNA): 检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

①引物合成: 利用 PCR 引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计出一条幽门螺杆菌尿素酶 B 基因 (*ureB*) 特异的引物: 5' GTT GCT CCT AAA AAA TCC T 3' 和一条大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因特异的引物: 5' AAA GCC GTG GCA CAG GCA AGC GT 3', 利用 DNA 自动合成仪 (PE 公司) 按照此二核苷酸引物序列合成相应的寡核苷酸引物。在合成这两条寡核苷酸引物过程中, 于每条引物序列的 5' 端均添加 20 个额外的胸腺嘧啶核苷 ( $\text{poly}(\text{dT})_{20}$ ), 并对所合成寡核苷酸引物的 5' 端进行氨基修饰。通过聚乙烯酰胺 (PAGE) 凝胶电泳对合成的寡核苷酸进行纯化。所述的纯化方法是本领域技术人员已知的。

②基因芯片的制备: 将合成的两条寡核苷酸引物分别溶于适当体积的无菌去离子水中, 使引物的终浓度都为 60  $\mu\text{M}$ 。分别从引物溶液中吸取 5  $\mu\text{l}$  置于微量离心管内, 并分别向微量离心管中加入 5  $\mu\text{l}$  的二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma, 美国)。将引物溶液和二甲基亚砜充分混匀后, 取 5  $\mu\text{l}$  置于 386 孔板的相应孔中。以醛基修饰的玻璃片 (CSS-100 Silylated Slides, CEL Associates, Inc., 休斯敦, 美国) 作为固相载体。利用 GSI Flexys 基因芯片点样仪 (Genomic Solution, 美国) 将引物按照 3×3 的矩形点阵点到玻璃片上相应的位置处 (即微排序点样), 引物 5' 端的氨基与玻璃片表面的醛基反应形成酰氨键而将引物固定在玻璃片上。这样,

不同位置上的寡核苷酸引物矩阵便分别对应于幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因。室温下将基因芯片避光放置至少 24 小时。

③Taq 酶延伸固相引物检测幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因：按照本领域技术人员已知的 DNA 提取方法，制备四种待测的 DNA 样品：含有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因的 DNA 样品、含有大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的 DNA 样品、混合有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的 DNA 样品、不含有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的 DNA 样品，利用上述的基因芯片，采用固相引物延伸技术分别检测这四种 DNA 样品。

简言之，配制 20-200  $\mu$ l PCR 反应液，其成分如下：1 $\times$ Taq 酶反应缓冲液、2.0mM  $MgCl_2$ 、各 200  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP、Taq 酶 0.5u/20  $\mu$ l、适量的待测 DNA 样品（预变性或不预变性均可）。取 PCR 反应液适量加入到基因芯片上的反应池中，密闭反应池以防反应液蒸发。开始固相引物延伸的 PCR 反应。

反应池可由以下方式形成：(1)在基因芯片上寡核苷酸引物矩阵的四周，用涂有粘胶的薄橡胶条、硅胶条、塑料条等，或 gene frame 原位框（GENE 公司）围成一个反应池，加入 PCR 反应液后，在反应池上覆盖玻片或硅烷化后的盖玻片或塑料片或聚乙烯薄膜等，使反应池密闭。(2)在 PCR 反应液中加入 GENE 公司的 Self-seal 自动防蒸剂，然后滴加 PCR 反应液覆盖寡核苷酸引物矩阵，在 PCR 反应液上覆盖玻片或硅烷化后的盖玻片或塑料片或聚乙烯薄膜等，在 PCR 反应过程中，由于高温，边缘的液体蒸发而形成固体胶墙，从而形成一个密闭的 PCR 反应池。(3)预先对基因芯片的固相载体进行蚀刻，使在进行微排序点样的区域形成凹陷；在此凹陷区域进行微排序点样后，加入 PCR 反应液，直接在基因芯片的固相载体表面覆盖涂有粘胶的盖玻片、玻片或塑料片等，即可形成密闭的反应池。(4)预先对基因芯片的固相载体进行蚀刻，使在进行微排序点样的区域形成凹陷；在此凹陷区域进行微排序点样后，直接在在基因芯片的固相载体表面覆盖涂有粘胶的盖玻片、玻片或塑料片等，形成反应池，此反应池有反应液进口和出口，加入 PCR 反应液后，关闭反应液进口和出口即形成密闭的反应池。

还有一种不需要在基因芯片形成密闭反应池就可进行固相引物延伸的 PCR 反应的方式，即配制较大体积的 PCR 反应液，直接将基因芯片浸入 PCR 反应液中就可进行 PCR 反应。

所述的 PCR 反应是，以 88-94 $^{\circ}C$  10-300 秒，40-65 $^{\circ}C$  10-300 秒，72 $^{\circ}C$  10-300 秒的循环参数进行 1 次循环以上，最后于 72 $^{\circ}C$  进行延伸反应 10 秒至数分钟。

PCR 反应结束后，对于上述的(1)、(2)、(3)种反应池，揭去反应池上覆盖的盖玻片或塑料片等物，暴露微排序点样区域；对于上述的第(4)种反应池，从反应液出口或入口移去 PCR 反应液；对于上述的将基因芯片直接浸入 PCR 反应液所进行的反应，则直接取出基因芯片。用水或 TE 缓冲液或杂交缓冲液（12 $\times$ SSC，0.2%SDS）等洗涤基因芯片的微排序点样区，去除芯

片表面未反应的 PCR 反应液的成分。

洗涤结束,取出后自然凉干。利用 GeneTAC 2000 基因芯片扫描仪(Genomic Solution Inc., 美国),在 532nm 的激发光波长下进行扫描并自动曝光。分析扫描结果,并对荧光信号进行寻址,并与特异性寡核苷酸探针相对应,确定标本中的目标 DNA 或目标基因。

- 5 检测结果:①对于只含有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因 DNA 的样品,基因芯片只在幽门螺杆菌尿素酶 B 基因特异引物的矩阵点样区域发出荧光信号。②对于只含有大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因 DNA 的样品,基因芯片只在大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因特异引物的矩阵点样区域发出荧光信号。③对于混合有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因 DNA 的样品,基因芯片在幽门螺杆菌尿素酶 B 基因特异引物的矩阵点样区域和大肠杆菌外膜蛋白  
10 phoE 基因特异引物的矩阵点样区域都发出了荧光信号。④对于不含有幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因 DNA 的样品,基因芯片上无荧光信号出现。

实施例 2 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片,用 Taq 酶进行固相引物延伸以检测目标基因(目标 DNA):检测幽门螺杆菌(*H. pylori*)尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因的基因芯片。  
15

① 引物合成:所合成的引物的核苷酸序列同实施例 1,于每条引物序列的 5'端均添加 20 个额外的尿嘧啶核苷( $\text{poly}(\text{dU})_{20}$ ),但对所合成寡核苷酸引物的 5'端进行的是巯基修饰,具体而言,修饰的基团是将 Cruachem 公司的  $\text{C}_6$  disulphide phosphoramidite 连接到引物的 5'端而得到的。

20 ② 基因芯片的制备:方法和步骤同实施例 1,但所用的固相载体是用 3-Mercaptopropyl trimethoxysilane 处理而得到的巯基修饰的玻璃片。玻璃片表面的巯基与引物 5'端的  $\text{C}_6$  disulphide phosphoramidite 反应,形成二硫键而将引物固定在玻璃片上。

③ 用 Taq 酶延伸固相引物检测幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因:固相引物延伸的 PCR 反应条件、反应池的准备、反应后基因芯片的洗涤和扫描以及检测  
25 结果都同实施例 1。

实施例 3 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片,用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段进行固相引物延伸以检测目标基因(目标 DNA):检测幽门螺杆菌(*H. pylori*)尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因的基因芯片。

30 ① 除于每条引物序列的 5'端均添加 20 个额外的腺嘌呤核苷( $\text{poly}(\text{dA})_{20}$ )外,引物序列、对所合成的寡核苷酸的 5'端进行的巯基修饰和基因芯片的制备均同实施例 2。

② 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段延伸固相引物以检测幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠

### 杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因:

按照实施例 1 所述的方法制备四种待测的 DNA 样品, 将它们预变性, 即在 99℃ 变性 2 分钟后立即置于冰浴。利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下: 配制反应液, 使得在 50 μl 终体积中含有 1 × 大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段反应缓冲液、50 个单位的大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段、各 200 μM 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100 μM 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域, 于 37℃ 温育 2 小时。反应结束后, 用水或 TE 缓冲液或杂交缓冲液 (12 × SSC, 0.2% SDS) 等洗涤基因芯片的微排序点样区, 去除芯片表面未反应的反应液成分。

10 洗涤结束, 取出后自然凉干。利用 GeneTAC 2000 基因芯片扫描仪 (Genomic Solution Inc., 美国), 在 532nm 的激发光波长下进行扫描并自动曝光。分析扫描结果, 并对荧光信号进行寻址, 并与特异性寡核苷酸引物相对应, 确定标本中的目标 DNA 或目标基因。

检测结果: 同实施例 1。

15 实施例 4 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶进行固相引物延伸以检测目标基因 (目标 DNA): 检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

除于每条引物序列的 5' 端均添加聚乙二醇臂 (spacer amidite, 18 atom spacer phosphoramidite, Cruachem 公司) 并在相当于引物 5' 端的聚乙二醇臂末端用 C<sub>6</sub> disulphide phosphoramidite 进行巯基修饰外, 引物序列、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实施例 3 相同。

利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶, 按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下: 配制反应液, 使得在 50 μl 终体积中含有 1 × 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 反应缓冲液、50 个单位的大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 全酶、各 200 μM 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100 μM 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域, 于 37℃ 温育 2 小时。

反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

30 实施例 5 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片, 用 T4 噬菌体 DNA 聚合酶进行固相引物延伸以检测目标基因 (目标 DNA): 检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

引物序列、引物的合成、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实

实施例 3 相同。

利用 T4 噬菌体 DNA 聚合酶,按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下:配制反应液,使得在 50  $\mu$ l 终体积中含有 1  $\times$  T4 噬菌体 DNA 聚合酶反应缓冲液、4 个单位的 T4 噬菌体 DNA 聚合酶、各 200  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域,于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

实施例 6 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片,用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶进行固相引物延伸以检测目标基因(目标 DNA):检测幽门螺杆菌(*H. pylori*)尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

引物序列、引物的合成、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实施例 3 相同。

利用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶,按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下:配制反应液,使得在 50  $\mu$ l 终体积中含有 1  $\times$  T7 噬菌体 DNA 聚合酶反应缓冲液、4 个单位的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶、各 200  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域,于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

实施例 7 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片,用测序酶进行固相引物延伸以检测目标基因(目标 DNA):检测幽门螺杆菌(*H. pylori*)尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

测序酶是经过修饰而去除了 3'  $\rightarrow$  5' 外切核酸酶活性,但聚合酶活性仍保留的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶。

本实施例的引物序列、引物合成、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实施例 3 相同。

利用 T7 噬菌体 DNA 聚合酶,按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下:配制反应液,使得在 50  $\mu$ l 终体积中含有 1  $\times$  测序酶反应缓冲液、4 个单位的测序酶、各 200  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 100  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域,于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

实施例 8 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片，用禽源反转录酶进行固相引物延伸以检测目标基因（目标 DNA）：检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

本实施例的引物序列、引物合成、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实施例 3 相同。

利用禽源反转录酶，按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下：配制反应液，使得在 50  $\mu$ l 终体积中含有 1  $\times$  禽源反转录酶反应缓冲液、4 个单位的禽源反转录酶、各 400  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 200  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域，于 42  $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

15 实施例 9 通过二硫键将引物连接在固相载体上制成基因芯片，用鼠源反转录酶进行固相引物延伸以检测目标基因（目标 DNA）：检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

本实施例的引物序列、引物合成、基因芯片的制备、四种待测 DNA 样品的制备及预变性都与实施例 3 相同。

20 利用鼠源反转录酶，按照本领域技术人员已知的方法延伸基因芯片上的引物并对延伸产物 DNA 单链进行荧光素标记。具体如下：配制反应液，使得在 50  $\mu$ l 终体积中含有 1  $\times$  鼠源反转录酶反应缓冲液、4 个单位的鼠源反转录酶、各 400  $\mu$ M 的 dATP、dTTP 和 dGTP、各 200  $\mu$ M 的 dCTP 和 Cy3-dCTP 以及适量的预变性后的待测 DNA 样品。用反应液覆盖基因芯片上寡核苷酸引物矩阵区域，于 37  $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

25 反应后的洗涤、荧光扫描和检测结果同实施例 3。

实施例 10. 通过硫醚键将引物连接在固相载体上制成基因芯片，用 Taq 酶进行固相引物延伸以检测目标基因（目标 DNA）：检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 *phoE* 基因的基因芯片。

30 ① 引物合成：所合成的引物的核苷酸序列同实施例 1，但对引物的 5'端进行的是乙烯基修饰，具体而言，修饰的基团是将 Mosaic Technologies 公司的 Acrydite 连接到引物的 5'端而得到的。

- ② 基因芯片的制备：固相载体的处理方法同实施例 2，是用 3-Mercaptopropyl trimethoxysilane 处理而得到的巯基修饰的玻璃片。玻璃片表面的巯基与引物 5'端的乙烯基反应，形成硫醚键而将引物固定在玻璃片上。
- ③ 用 Taq 酶延伸固相引物检测幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因：固相引物延伸的 PCR 反应条件、反应池的准备、反应后基因芯片的洗涤和扫描以及检测结果都同实施例 1。

实施例 11. 通过非共价键将引物连接在固相载体上制成基因芯片，用 Taq 酶进行固相引物延伸以检测目标基因（目标 DNA）：检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因的基因芯片。

- ① 引物合成：所合成的引物的核苷酸序列同实施例 1，但在合成时将引物的 5'端标记上生物素（biotin）。
- ④ 基因芯片的制备：将固相载体用链霉亲和素（streptavidin）或亲和素（avidin）以 5 mg/L 的浓度包被，4℃过夜。然后加入封闭剂，4℃过夜。用水洗涤后自然干燥，置 4℃保存，从而得到链霉亲和素或亲和素修饰的玻璃片。玻璃片表面的链霉亲和素或亲和素与引物 5'端的生物素结合，形成非共价键而将引物固定在玻璃片上。
- ⑤ 用 Taq 酶延伸固相引物检测幽门螺杆菌尿素酶 B 基因和大肠杆菌外膜蛋白 phoE 基因：固相引物延伸的 PCR 反应条件、反应池的准备、反应后基因芯片的洗涤和扫描以及检测结果都同实施例 1。